

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Februar 2005 (10.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/012316 A3

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : C12N 9/02, 9/10, A01K 67/027	C11B 1/02,	103 47 869.8	10. Oktober 2003 (10.10.2003)	DE
		103 59 593.7	18. Dezember 2003 (18.12.2003)	DE
		10 2004 009 457.8		
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP2004/007957		27. Februar 2004 (27.02.2004)	DE
(22) Internationales Anmeldedatum:		10 2004 012 370.5	13. März 2004 (13.03.2004)	DE
	16. Juli 2004 (16.07.2004)	10 2004 024 014.0	14. Mai 2004 (14.05.2004)	DE
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl- Bosch-Str.38, 67056 Ludwigshafen (DE).		
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch			
(30) Angaben zur Priorität:		(72) Erfinder; und		
103 35 992.3	1. August 2003 (01.08.2003)	DE		
103 44 557.9	24. September 2003 (24.09.2003)	DE	(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZANK, Thorsten [DE/DE]; Seckenheimer Str. 4-6, 68165 Mannheim	

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF MULTIPLY-UNSATURATED FATTY ACIDS IN TRANSGENIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN TRANSGENEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of multiply-unsaturated fatty acids in an organism, into which nucleic acids have been introduced, which code for polypeptides with  $\Delta$ -5 elongase activity. Said nucleic acid sequences, optionally with further nucleic acid sequences, coding for polypeptides for the biosynthesis of fatty acids and lipid metabolism, are advantageously expressed in the organism. Nucleic acid sequences coding for a  $\Delta$ -6 desaturase, a  $\Delta$ -5 desaturase,  $\Delta$ -4 desaturase and/or  $\Delta$ -6 elongase activity are particularly advantageous and, advantageously, said saturases and elongases are derived from *Thalassiosira*, *Euglena* or *Ostreococcus*. The invention further relates to a method for the production of oils and/or triacylglycerides with an increased content of long-chain, multiply-unsaturated fatty acids. A particular embodiment of the invention is a method for the production of unsaturated  $\omega$ -3 fatty acids and a method for the production of triglycerides with an increased content of unsaturated fatty acids, in particular, of  $\Delta$ -3 fatty acids with more than three double bonds. Also disclosed is the production of a transgenic organism, preferably a transgenic plant, or a transgenic microorganism with increased content of  $\omega$ -3 fatty acids, oils or lipids with  $\omega$ -3 double bonds as a result of the expression of the elongases and desaturases employed in the above method, preferably in combination with  $\omega$ -3 desaturases, for example a  $\omega$ -3 desaturase from fungi of the family Pythiaceae such as the genus *Phytophthora*, for example, the genus and species *Phytophthora infestans*, or a  $\omega$ -3 desaturase from algae such as the family Prasinophyceae, for example, the genus *Ostreococcus* and, particularly, the genus and species *Ostreococcus tauri* or diatomaceae such as the genus *Thalassiosira* and, particularly, the genus and species *Thalassiosira pseudonana*. The invention also relates to the nucleic acid sequences, nucleic acid constructs, vectors and organisms containing the nucleic acid sequences and/or the nucleic acid constructs and transgenic organisms containing said nucleic acid sequences, nucleic acid constructs and/or vectors. A further part of the invention relates to oils, lipids and/or fatty acids produced according to the above method and use thereof and, furthermore, unsaturated fatty acids and triglycerides with an increased content of unsaturated fatty acids and use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einem Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Thalassiosira*, *Euglena* oder *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die vorliegende Erfindung betrifft ausserdem in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten  $\omega$ -3 Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders von  $\omega$ -3 Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\omega$ -3-Doppelbindungen aufgrund der Expression der im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/012316 A3



(DE). **BAUER, Jörg** [DE/DE]; Thorwaldsenstr. 4A, 67061 Ludwigshafen (DE). **CIRPUS, Petra** [DE/DE]; Landteilstr. 12, 68163 Mannheim (DE). **ABBADI, Amine** [DE/DE]; Lübbersmeyer Weg 26, 22549 Hamburg (DE). **HEINZ, Ernst** [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). **QIU, Xiao** [CN/CA]; 403 Kendarine Road, Saskatoon, Sk., S7N 3S5 (CA). **VRINTEN, Patricia** [CA/CA]; 725 310 Stillwater Drive, Saskatoon, Sk. S7J 4H5 (CA). **SPERLING, Petra** [DE/DE]; Eberhardstr. 9, 22041 Hamburg (DE). **DOMERGUE, Frederic** [FR/DE]; Bahrenfelder Steindamm 98, 22761 Hamburg (DE). **MEYER, Astrid** [DE/DE]; Jessenstr. 14, 22767 Hamburg (DE). **KIRSCH, Jelena** [DE/DE]; Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg (DE).

(74) **Anwalt: PRESSLER, Uwe**; c/o BASF Aktiengesellschaft, Carl-Bosch-Str.38, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:** 6. Oktober 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

vorteilhaft in Verbindung mit  $\omega$ -3-Desaturasen z.B. einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Pilzen der Familie Pythiaceae wie der Gattung Phytophthora beispielsweise der Gattung und Art Phytophthora infestans oder einer  $\omega$ -3-Desaturase aus Algen wie der Familie der Prasinophyceae z.B. der Gattung Ostreococcus speziell der Gattung und Art Ostreococcus tauri oder Diatomeen wie der Gattung Thalassiosira speziell der Gattung und Art Thalassiosira pseudonana. Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemässen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthaltend die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren und deren Verwendung. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.